

(19) 世界知的所有權機關  
國際事務局



(43) 國際公開日  
2003 年 10 月 9 日 (09.10.2003)

**PCT**

(10) 国際公開番号  
WO 03/082882 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C07F 9/09, C08G 65/335, A61K 7/00, 7/48, 9/127, 47/24, A61P 35/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/03966

(22) 国際出願日: 2003 年 3 月 28 日 (28.03.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2002-93694 2002 年 3 月 29 日 (29.03.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日本油脂株式会社 (NOF CORPORATION) [JP/JP]: 〒150-6019 東京都渋谷区恵比寿四丁目 2 番 3 号 Tokyo (JP). 第一製薬株式会社 (DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]: 〒103-8234 東京都中央区日本橋 3 丁目 1 番 10 号 Tokyo (JP).

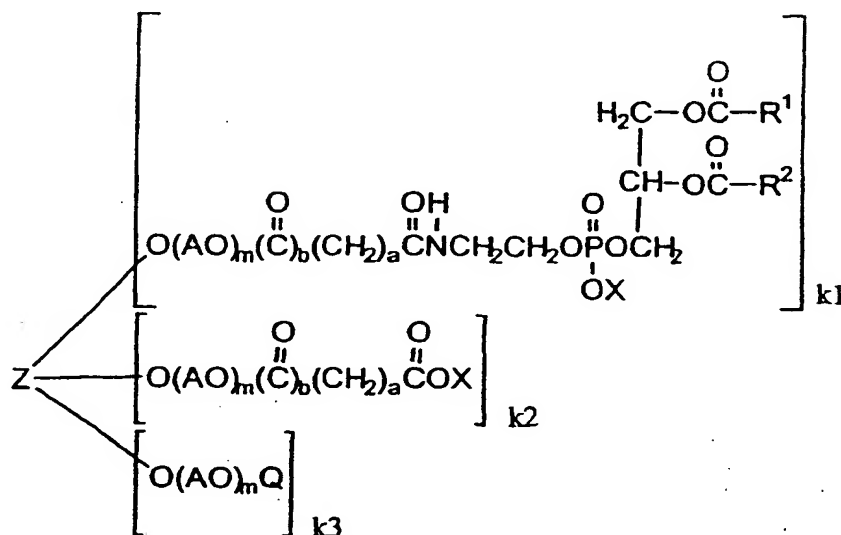
(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 伊藤 智佳 (ITOHI, Chika) [JP/JP]: 〒212-0051 神奈川県川崎市幸区東古市場 1 0 3-2 0 3 Kanagawa (JP). 久保和弘 (KUBO, Kazuhiro) [JP/JP]: 〒213-0022 神奈川県川崎市高津区千年 8 7 6-3 0 1 Kanagawa (JP). 大橋俊輔 (OHASHI, Syunsuke) [JP/JP]: 〒210-0804 神奈川県川崎市川崎区藤崎 2-3-9 Kanagawa (JP). 安河内 徹 (YASUKOHCHI, Tohru) [JP/JP]: 〒224-0033 神奈川県横浜市都筑区茅ヶ崎東 1-1-3-4 0 1 Kanagawa (JP). 菊池 寛 (KIKUCHI, Hiroshi) [JP/JP]: 〒134-8630 東京都江戸川区北葛西 1 丁目 1 番 1 3 号 第一製薬株式会社 東京研究開発センター内 Tokyo (JP). 鈴木 則男 (SUZUKI, Norio) [JP/JP]: 〒134-8630 東京都江戸川区北葛西 1 丁目 1 番 1 3 号 第一製薬株式会社 東京研究開発センター内 Tokyo (JP). 黒沢 三保 (KUROSAWA, Miho) [JP/JP]: 〒428-0021 静岡県榛原郡金谷町金谷河原 5 8 8 番地 第一製薬株式会社 静岡工場内 Shizuoka (JP). 山内 仁

**[統葉有]**

(54) Title: PHOSPHOLIPID DERIVATIVE

(54) 発明の名称: リン脂質誘導体



(1)

(S7) **Abstract:** A phospholipid derivative which is highly safe for the living body and is suitably for use in solubilizing or dispersing a physiologically active substance, etc. or in the field of drug delivery systems, e.g., a liposome, or cosmetics. It is represented by the formula (I) [wherein Z represents a residue of a compound having 3 to 10 hydroxy groups; AO represents C<sub>2-4</sub> oxyalkylene; R<sup>1</sup>CO and R<sup>2</sup>CO each represents C<sub>8-22</sub> acyl; X represents hydrogen, an alkali metal, ammonium, or an organic ammonium; a is an integer of 0 to 4; b is 0 or 1; Q represents hydrogen or methyl; m indicates the average number of moles of the oxyalkylene added; and m, k1, k2, and k3 are numbers satisfying the following requirements:  $3 \leq m \leq 200$ ,  $9 \leq m \times (k1 + k2 + k3) \leq 1000$ ,  $1 \leq k1 \leq 2$ ,  $0 \leq k2 \leq 9$ ,  $0 \leq k3 \leq 9$ , and  $3 \leq k1 + k2 + k3 \leq 10$ ].

〔統葉有〕

WO 03/082882 A1

史 (YAMAUCHI, Hitoshi) [JP/JP]; 〒569-0806 大阪府  
高槻市 明田町 4 番 3 8 号 第一製薬株式会社 大阪工  
場内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.): 〒104-0031 東京都中央区京橋一丁目8番7号  
京橋日殖ビル8階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

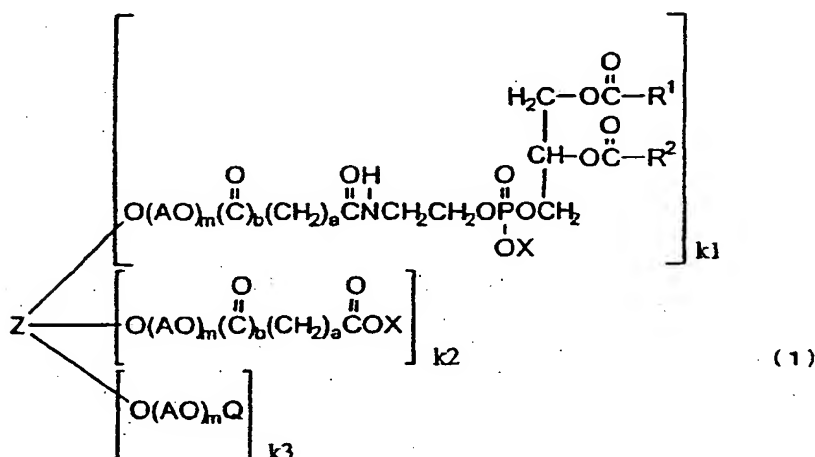
一 國際調查報告書

一 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

生体に対して安全性が高く、生理活性物質等の可溶化及び分散、あるいはリポソームなどドラッグデリバリーシステム又は化粧料の分野において好適に利用することができるリン脂質誘導体であつて、式(1) (Zは3~10個の水酸基をもつ化合物の残基を示し; AOは炭素数2~4のオキシアルキレン基を示し; R<sup>1</sup>CO及びR<sup>2</sup>COは炭素数8~22のアシル基を示し; Xは水素原子、アルカリ金属原子、アンモニウム、又は有機アンモニウムを示し; aは0~4の整数を示し; bは0又は1を示し; Qは水素原子又はメチル基を示し; mはオキシアルキレン基の平均付加モル数を示し; m、k<sub>1</sub>、k<sub>2</sub>、及びk<sub>3</sub>は下記の条件:  $3 \leq m \leq 200$ ,  $9 \leq m \times (k_1 + k_2 + k_3) \leq 1000$ ,  $1 \leq k_1 \leq 2$ ,  $0 \leq k_2 \leq 9$ , 及び  $0 \leq k_3 \leq 9$  であり、かつ  $3 \leq k_1 + k_2 + k_3 \leq 10$  を満足する数である) で表されるリン脂質誘導体。



## 明 細 書

## リン脂質誘導体

## 技術分野

本発明は、分岐したポリアルキレンオキシドを含むリン脂質誘導体及びその製造方法に関する。また、本発明は該リン脂質誘導体を含む界面活性剤、可溶化剤、化粧料用分散剤、及び脂質膜構造体に関する。

## 背景技術

リポソーム製剤に代表される微粒子性薬剤キャリアー及び蛋白製剤等のポリペプチドは静脈内に投与した場合に血液中での滞留性が悪く、肝臓、脾臓などの細網内皮系組織（reticuloendothelial system：以下「RES」と略する。）に捕捉され易いことが知られている。RESの存在は、RES以外の臓器へ医薬を送達させるターゲッティング型製剤や、長時間にわたって血液中に製剤を滞留させ、医薬の放出をコントロールする徐放型製剤としての微粒子性医薬キャリアーを利用するに際して大きな障害となる。

従来から、上記製剤に微小循環性を付与するための研究がなされてきた。例えば、リポソームの脂質二分子膜の物理化学的性質は比較的容易に調節可能であることから、リポソームのサイズを小さくすることで血中濃度を高く維持させる方法（バイオキミカ・エト・バイオフィジカ・アクタ、761巻、142頁、1983年）、相転移温度の高いレシチンを利用する方法（バイオケミカル・ファーマコロジー、32巻、3381頁、1983年）、レシチンの代わりにスフィンゴミエリンを用いる方法（バイオケミカル・ファーマコロジー、32巻、3381頁、1983年）、リポソームの膜成分としてコレステロールを添加する方法（バイオキミカ・エト・バイオフィジカ・アクタ、761巻、142頁、1983年）などが提案されている。しかしながら、これらの方法で、血中滞留性がよ

く、かつRESに取り込まれにくい微粒子性医薬キャリアを提供した例は知られていない。

また、その他の解決方法として、リポソームの膜表面を糖脂質、糖タンパク質、アミノ酸脂質、又はポリエチレングリコール脂質などで修飾し、微小循環性を付与するとともにRESを回避する研究が行われている。例えば、グリコフォン（日本薬学会第106年会講演要旨集、336頁、1986年）、ガングリオシドGM1（FEBSレター、223巻、42頁、1987年）、ホスファチジルイノシトール（FEBSレター、223巻、42頁、1987年）、グリコフォンとガングリオシドGM3（特開昭63-221837号公報）、ポリエチレングリコール誘導体（FEBSレター、268巻、235頁、1990年）、グルクロン酸誘導体（ケミカル・アンド・ファーマシューティカル・ブレットン、38巻、1663頁、1990年）、グルタミン酸誘導体（バイオキミカ・エト・バイオフィジカ・アクタ、1108巻、257頁、1992年）、ポリグリセリンリン脂質誘導体（特開平6-228012号公報）などがその修飾物質として報告されている。

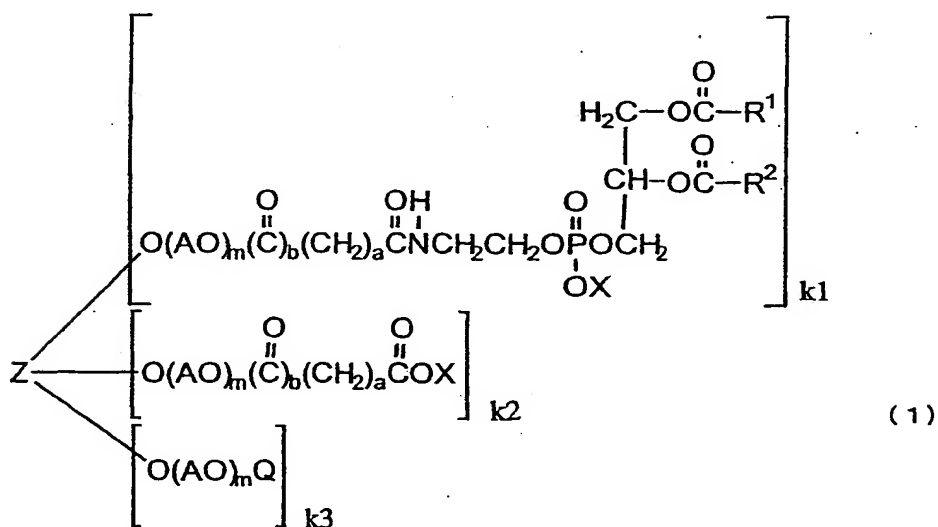
ポリペプチドを修飾する場合には、その結合点を減らしてポリペプチド中のリジン残基等の活性基の残存量を上げる目的で、トリアジンを用いて2本の水溶性高分子を導入した報告等がある。リポソーム製剤においても、水溶性高分子の分子量を上げる目的でトリアジンに2本の水溶性高分子を導入し、それを用いてリポソーム表面を修飾した報告がある。この修飾は2本までに限られている。この場合、リポソーム表面に微小循環性を付与する効果が親水性基を有する場合より小さいことが考えられる。さらに、ポリアルキレンオキシド基を含むリン脂質誘導体は界面活性剤としても用いられているが、生体に対して安全性が高く、高塩濃度条件で安定に使用できるものは知られていなかった。

#### 発明の開示

本発明の課題は、ポリアルキレンオキシドを含む新規なリン脂質誘導体を提供

することにある。より具体的には、生体に対して安全性が高く、生理活性物質等の可溶化及び分散、あるいはリポソームなどドラッグデリバリーシステム又は化粧料の分野において好適に利用することができるリン脂質誘導体を提供することが本発明の課題である。本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、下記的一般式で表される新規なリン脂質誘導体及びその製造方法を提供することに成功した。

すなわち、本発明は、下記的一般式（１）：



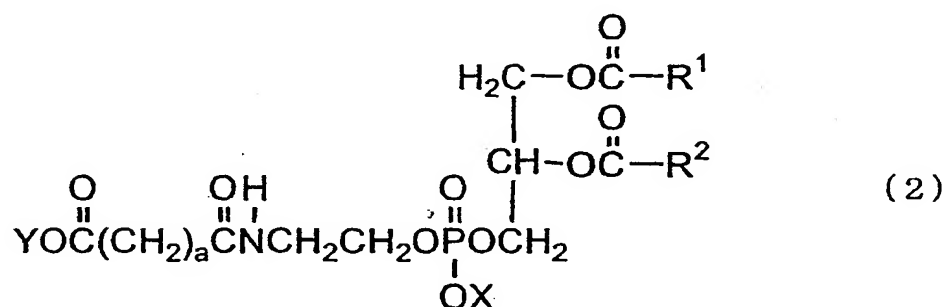
（式中、Zは3～10個の水酸基をもつ化合物の残基を示し；AOは炭素数2～4のオキシアルキレン基を示し；R<sup>1</sup>CO及びR<sup>2</sup>COはそれぞれ独立に炭素数8～22の炭化水素基を示し；Xは水素原子、アルカリ金属原子、アンモニウム、又は有機アンモニウムを示し；aは0～4の整数を示し；bは0又は1を示し；Qは水素原子又はメチル基を示し；mはオキシアルキレン基の平均付加モル数を示し；m、k<sub>1</sub>、k<sub>2</sub>、及びk<sub>3</sub>は下記の条件：3 ≤ m ≤ 200、9 ≤ m × (k<sub>1</sub> + k<sub>2</sub> + k<sub>3</sub>) ≤ 1000、1 ≤ k<sub>1</sub> ≤ 2、0 ≤ k<sub>2</sub> ≤ 9、及び0 ≤ k<sub>3</sub> ≤ 9であり、かつ3 ≤ k<sub>1</sub> + k<sub>2</sub> + k<sub>3</sub> ≤ 10を満足する数である）で表されるリン脂質誘導体を提供するものである。

上記の発明の好ましい態様によれば、4 ≤ k<sub>1</sub> + k<sub>2</sub> + k<sub>3</sub> ≤ 8である上記の

リン脂質誘導体； $R^1CO$ 及び $R^2CO$ がそれぞれ独立に炭素数12～20のアシル基である上記のリン脂質誘導体； $k_2$ が0である上記のリン脂質誘導体； $a$ 及び $b$ が0である上記のリン脂質誘導体；及び $k_3 < 1$ であり、かつ $k_2 > k_3$ である上記のリン脂質誘導体が提供される。

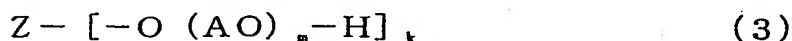
別の観点からは、本発明により、上記一般式(1)で表されるリン脂質誘導体を含む界面活性剤；上記一般式(1)で表されるリン脂質誘導体を含む可溶化剤；上記一般式(1)で表されるリン脂質誘導体を含む分散剤、好ましくは化粧料用の分散剤；上記一般式(1)で表されるリン脂質誘導体を含有する脂質膜構造体、好ましくはリポソームが提供される。

さらに別の観点からは、上記一般式(1)で表されるリン脂質誘導体の製造方法であって、下記一般式(2)：



(式中、 $R^1$ 及び $R^2$ はそれぞれ独立に炭素数8～22の炭化水素基を示し； $R^3$ は炭素数2～4の2価の炭化水素基を示し； $X$ は水素原子、アルカリ金属原子、アンモニウム、又は有機アンモニウムを示し； $a$ は0～4の整数を示し； $Y$ は水素原子又は $N$ -ヒドロキシコハク酸イミドを示す)

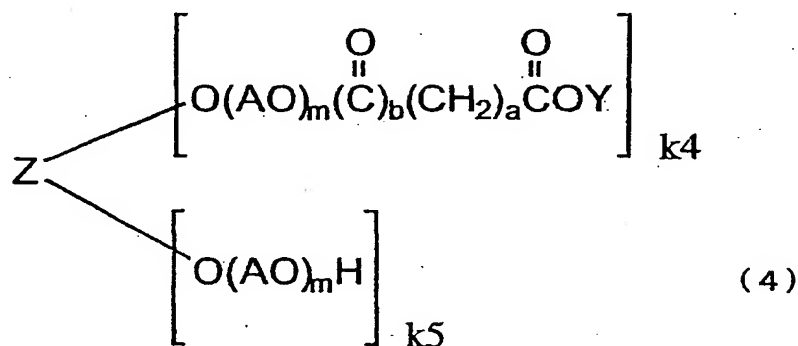
で示されるリン脂質化合物と下記一般式(3)：



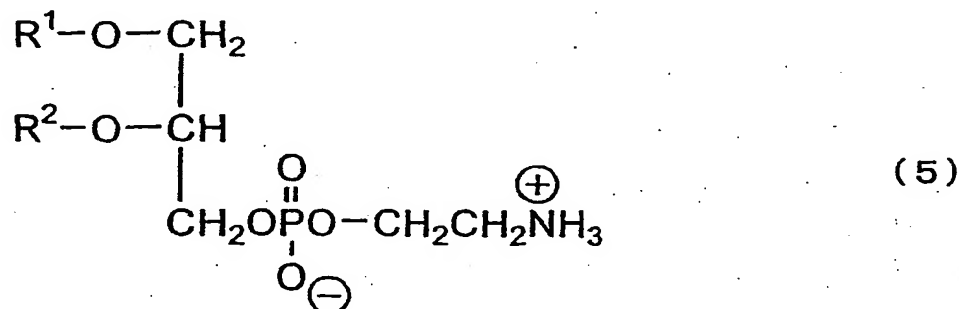
(式中、 $Z$ は3～10個の水酸基をもつ化合物の残基を示し； $AO$ は炭素数2～4のオキシアルキレン基の1種又は2種以上を示し、2種以上のオキシアルキレン基を示す場合にはブロック状でもランダム状でもよく； $m$ はオキシアルキレン基の平均付加モル数でを示し； $m$ 及び $k$ は下記の条件： $3 \leq m \leq 200$ 、 $9 \leq k$

$\times k \leq 1000$ 、 $3 \leq k \leq 10$ を満足する数である)で表されるポリアルキレンオキシド化合物とを有機溶媒中で塩基性触媒の存在下に反応させる工程(以下、「工程A」と呼ぶ場合がある)を含む方法が提供される。この方法は好ましくは $20 \sim 90^\circ\text{C}$ の範囲で行うことができ、脱水縮合剤の存在下で行うことが好ましい。

また、上記の一般式(1)で表されるリン脂質誘導体の製造方法であって、下記一般式(4)：



(式中、Zは3～10個の水酸基をもつ化合物の残基を示し；aは0～4の整数を示し；bは0又は1を示し；mはオキシアルキレン基の平均付加モル数を示し；Yは水素原子又はN-ヒドロキシコハク酸イミドを示し；k4及びk5は下記の条件： $1 \leq k4 \leq 10$ 、 $0 \leq k5 \leq 9$ 、 $3 \leq k4 + k5 \leq 10$ を満足する数である)で表されるポリアルキレンオキシド誘導体と下記一般式(5)：



(式中、 $\text{R}^1$ 及び $\text{R}^2$ 上記式(1)における定義と同義である)で表されるリン脂

質誘導体とを有機溶媒中で塩基性触媒の存在下に反応させる工程を含む方法も提供される。この方法は好ましくは20～90℃の範囲で行うことができる。

#### 発明を実施するための最良の形態

式(1)で示される本発明のリン脂質誘導体において、Zは3～10個の水酸基を有する化合物の残基である。3～10個の水酸基を有する化合物の種類は特に限定されないが、例えば、グリセリン、ジグリセリン、ペンタエリスリトール、トリグリセリン、テトラグリセリン、ペンタグリセリン、ヘキサグリセリン、ヘプタグリセリン及びオクタグリセリンなどのポリグリセリン化合物を挙げることができる。本明細書において、3～10個の水酸基を有する化合物の残基とは、化合物から $k_1$ 、 $k_2$ 、及び $k_3$ で表される分岐の合計数( $k_1 + k_2 + k_3$ )の水酸基を除いた残りの部分を意味している。

$k_1 + k_2 + k_3$ の値はZの分岐数に対応しており、3～10の範囲の整数、好ましくは3～8、より好ましくは4～8の範囲の整数である(本明細書において「～」で示される数値範囲は上限及び下限の数値を含む範囲である)。分岐数が3より小さい場合には化合物の所望の効果が達成できない場合があり、分岐数が10より大きい場合にはポリグリセリン等に代表される分岐型原料の粘性が大きくなり取り扱いが困難になる場合があり、原料の入手が困難になることもある。

$k_1$ は、式(2)で示されるリン脂質化合物の残基を含む部分構造がZで表される残基に結合する数を示しており、1又は2である。上記のリン脂質化合物を含む部分構造の数が0の場合には、疎水結合部分が存在しないためリポソームなどの脂質2重膜に安定に結合することができず、リポソームの膜修飾が困難である。また、上記のリン脂質化合物を含む部分構造の数が2より大きい場合には、1分子に含まれるリン脂質残基が多く、リポソーム膜に対する疎水結合が大きくなることから、ポリオキシエチレン鎖の自由度が小さくなり本発明の化合物の所望の効果が得られなくなる場合がある。

$R^1CO$ 及び $R^2CO$ はそれぞれ独立に炭素数8～24、好ましくは12～20、



より好ましくは14～18のアシル基を示す。アシル基の種類は特に限定されず、脂肪族アシル基又は芳香族アシル基のいずれを用いてもよいが、通常は脂肪酸に由来するアシル基を好適に用いることができる。 $R^1CO$ 及び $R^2CO$ の具体的なものとしては、例えばカプリル酸、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ステアリン酸、イソステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、アラキン酸、ベヘン酸、エルカ酸、リグノセリン酸などの飽和又は不飽和の直鎖又は分岐の脂肪酸由来のアシル基を挙げることができる。 $R^1CO$ 及び $R^2CO$ は同じであっても異なってもよい。炭素数が24を越える場合には、水相への分散が悪く反応性が低下する場合がある。また炭素数が8より少ない場合には、精製工程での結晶性が悪く、目的物の最終純度が低くなる場合がある。

k2は末端が $-COOX$ で表される部分構造がZで表される残基に結合する数を示しており、0～9の範囲から選択される。0である場合には、本発明の化合物には末端が $-COOX$ で表される部分構造が実質的に存在しないことを意味する。Xは水素原子、アルカリ金属原子、アンモニウム、又は有機アンモニウムを示し、好ましくは水素原子又はアルカリ金属原子である。具体的なものとしては、アルカリ金属原子としてナトリウム及びカリウム、有機アンモニウムとしてトリエチルアンモニウムなどを挙げることができる。

k3は末端が水酸基又はメチル基である部分構造がZで表される残基に結合する数を示しており、0～9の範囲から選択される。Qは水素原子又はメチル基である。Qがそれ以外のアルキル基である場合には、本発明の化合物の親水性が失われる場合がある。

bは0又は1の整数であり、bが1である場合にはaが1～4の整数であることが好ましく、aが2又は3であることがさらに好ましい。bが0である場合にはaが1または0であることが好ましく、aが0であることがさらに好ましい。

AOで表されるオキシアルキレン基は炭素数2～4、好ましくは2又は3のオキシアルキレン基であり、例えばオキシエチレン基、オキシプロピレン基、オキシトリメチレン基、オキシブチレン基などが挙げられる。これらの中ではオキシ

エチレン基、オキシプロピレン基が好ましく、特にオキシエチレン基が好ましい。  
—(AO)—で表されるポリオキシアルキレン基を構成するオキシアルキレン基は1種のみでもよいが、2種以上のオキシアルキレン基が組み合わされていてもよい。2種以上のオキシアルキレン基が組み合わされる場合には、組み合わせ方は特に限定されず、ポリオキシアルキレン基はブロック状であってもランダム状であってもよい。全オキシアルキレン基に対するオキシエチレン基の比率が低い場合は水溶性が低下する場合もあるので、全オキシアルキレン基に対するオキシエチレン基の比率は50～100モル%であることが好ましい。

mはオキシアルキレン基の平均付加モル数を表し、3～200、好ましくは7～80の数である。mが3より小さいと、本発明のリン脂質誘導体をドラッグデリバリーシステムに使用した場合に所望の効果が小さくなる場合がある。また200より大きいと、本発明のリン脂質誘導体を製造する際に、式(2)で表されるリン脂質化合物と式(3)で表されるポリアルキレンオキシド化合物との反応性が低下する場合があります、また式(3)で表されるポリアルキレンオキシド化合物の粘度が上昇して作業性が低下する場合もある。なお、mは本発明の化合物に存在する $[k_1 + k_2 + k_3]$ 個の個々の分岐に存在するポリオキシアルキレン基に含まれるオキシアルキレン基の個数を意味する。 $m \times [k_1 + k_2 + k_3]$ は、本発明の化合物全体に含まれるオキシアルキレン基の個数を意味し、9～1000、好ましくは20～700、より好ましくは30～350の数である。

式(1)で表される本発明の化合物の製造方法は特に限定されないが、 $k_2$ が0であるリン脂質誘導体は、例えば、工程Aにより高純度に製造することができる。工程(A)で使用する式(2)で示されるリン脂質化合物において、 $R^1$ 、 $R^2$ 、及びaは式(1)で説明したものと同一であり、Yは水素原子又はN-ヒドロキシコハク酸イミドである。

式(2)で示されるリン脂質化合物は公知の方法により製造することができる。例えば、後述するように、リン脂質化合物とジカルボン酸無水物とを反応させることにより容易に製造することができる。用いるリン脂質は天然リン脂質でも合

成リン脂質でもよく、例えば大豆及び大豆水添ホスファチジルジエタノールアミン、卵黄及び卵黄水添ホスファチジルジエタノールアミン等の天然及び合成ホスファチジルエタノールアミンなどが挙げられる。

工程 (A) で使用する式 (3) で示されるポリアルキレンオキシド化合物において、Z、AO、及びmは式 (1) で説明したものと同一である。kは式 (1) で説明されたk<sub>1</sub>、k<sub>2</sub>、及びk<sub>3</sub>の合計に相当する。式 (2) で示されるリン脂質化合物と式 (3) で示されるポリアルキレンオキシド化合物との反応は、有機溶媒中で塩基性触媒の存在下に行うことができ、通常は脱水縮合剤を用いて行うことができる。

塩基性触媒の種類は特に限定されないが、例えば、窒素含有物質としてはトリエチルアミン、ピリジン、ジメチルアミノピリジン、酢酸アンモニウム等が、有機塩としてはリン酸ナトリウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、ホウ酸ナトリウム及び酢酸ナトリウム等が挙げられる。塩基性触媒の量は、例えば、式 (2) で示されるポリアルキレンオキシド化合物の1.5～10倍モル、好ましくは2～5倍モルである。有機溶媒としては水酸基等の反応性官能基を有しないものであれば特に制限なく使用することができる。例えば酢酸エチル、ジクロロメタン、クロロホルム、ベンゼン及びトルエンなどが挙げられる。これらの中ではクロロホルム及びトルエンが好ましい。エタノールなどの水酸基を有する有機溶媒は、式 (2) で示されるポリアルキレンオキシド化合物の末端のカルボキシル基と反応する場合がある。

脱水縮合剤を用いる場合、式 (3) で表されるポリアルキレンオキシド化合物のカルボキシル基と式 (2) で表されるリン脂質の官能基とを脱水縮合できるものであれば特に制限なく使用できる。このような脱水縮合剤としては、ジシクロヘキシルカルボジイミド等のカルボジイミド誘導体が挙げられ、特にジシクロヘキシルカルボジイミドが好ましい。脱水縮合剤の使用量としては、例えば式 (3) で示されるポリアルキレンオキシド化合物の1.05～5倍モル、好ましくは1.5～2.5倍モルであるのが望ましい。N-ヒドロキシコハク酸イミドを反

応系中に式(3)で示されるポリアルキレンオキシド化合物に対して0.1～2倍モル加えることにより収率を高めることができる場合がある。

工程(A)の反応温度は、通常20～90℃の範囲であり、好ましくは40～80℃である。反応時間は1時間以上、好ましくは2～8時間とするのが望ましい。20℃より低温では反応率が低く、90℃より高温では反応に用いる式(2)で示されるリン脂質化合物のアシル基が加水分解する場合がある。

本発明の式(1)で表される化合物は、式(2)で表されるリン脂質化合物の活性化エステル誘導体と、式(3)で表されるポリアルキレンオキシド化合物とを反応させることによっても製造できる。上記活性化エステル誘導体は、例えば式(2)で表されるリン脂質化合物と活性化剤とを脱水縮合剤の存在下で反応させることにより得ることができる。上記活性化剤の種類は特に限定されないが、例えば、N-ヒドロキシコハク酸イミド、N, N'-ジコハク酸イミドカーボネート、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシイミド、N-ヒドロキシフタルイミド、4-ヒドロキシフェニルジメチルスルホニウム・メチルサルフェート、イソブチルクロロホルメートなどが挙げられる。これらの中ではN-ヒドロキシコハク酸イミドが好ましい。

式(2)で表されるリン脂質化合物と活性化剤との反応は、ジカルボン酸無水物との反応と同様、脱水縮合剤の存在下でカルボン酸と反応しない溶媒、例えばクロロホルム、トルエン等の反応溶媒中で反応温度15～80℃、好ましくは25～55℃で行うことができ、例えば、活性化剤をポリアルキレンオキシド化合物の溶液に分散攪拌することにより行うことができる。例えば、活性化剤としてN-ヒドロキシコハク酸イミドを使用した場合、式(2)で表されるリン脂質化合物のカルボキシル基と、N-ヒドロキシコハク酸イミドのイミド基とが反応し、式(2)で表されるリン脂質化合物のカルボキシル基側末端にN-ヒドロキシコハク酸イミドが結合した活性化エステル誘導体を得られる。

式(1)においてk<sub>2</sub>が0でないリン脂質誘導体、すなわち分岐したオキシア

ルキレン基末端がカルボキシル基である部分構造を有する化合物は、上記一般式（４）で表されるポリアルキレンオキシド誘導体と上記一般式（５）で表されるリン脂質誘導体とを有機溶媒中で塩基性触媒の存在下に反応することにより高純度に製造することができる。

反応に使用する有機溶媒は、水酸基等の反応性官能基を有しないものであれば特に制限なく使用することができる。例えば酢酸エチル、ジクロロメタン、クロロホルム、ベンゼン及びトルエンなどが挙げられる。これらの中ではクロロホルム及びトルエンが好ましい。エタノールなどの水酸基を有する有機溶媒は、式（４）で示されるポリアルキレンオキシド化合物の末端のカルボキシル基と反応する場合がある。

反応に使用する塩基性触媒の種類は特に限定されないが、例えば窒素含有物質としてはトリエチルアミン、酢酸アンモニウム等が、有機塩としてはリン酸ナトリウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、ホウ酸ナトリウム及び酢酸ナトリウム等が挙げられる。塩基性触媒の量は、例えば、式（４）で表されるポリアルキレンオキシド化合物の１．５～１０倍モル、好ましくは２～７倍モルであることが望ましい。反応温度は通常２０～９０℃、好ましくは４０～８０℃である。反応時間は１時間以上、好ましくは２～８時間である。２０℃より低温では反応率が低い場合があり、９０℃より高温では反応に用いる式（５）で示されるリン脂質化合物のアシル基が加水分解する場合がある。なお、本発明の化合物は合成により単一化合物として得られる場合もあるが、 $k_1$ 、 $k_2$ 、及び $k_3$ がそれぞれ異なる混合物として得られる場合もある。このような混合物も本発明の範囲に包含される。

上記一般式（１）で表される本発明の化合物を界面活性剤として用いることにより、可溶化液、乳化液、分散液を得ることができる。本発明の界面活性剤を乳化剤、可溶化剤または分散剤として用いる場合、乳化剤、可溶化剤または分散剤は、本発明の界面活性剤のみを用いてもよく、また乳化、可溶化または分散に用いられている公知の他の成分を含んでもよい。可溶化液または分散液の形態

は限定されず、水あるいは緩衝液などの分散媒に脂溶性物質等を溶解させた溶解液、水あるいは緩衝液などの分散媒に脂溶性物質等を分散させた分散液等が挙げられる。

乳化液または可溶化液の形態は限定されず、本発明の界面活性剤によって形成されたミセル溶液、すなわちその内部に脂溶性物質を含有したミセル溶液、また水あるいは緩衝液などの分散媒に本発明の界面活性剤と脂溶性物質等による分散粒子が、コロイド粒子あるいはそれ以上大きな粒子として存在するエマルション溶液等が挙げられる。ミセル溶液としては、分散粒子径が10～300 nmであるものを特に高分子ミセル溶液として挙げられる。エマルション溶液は、油相に脂溶性物質を配合したO/W型または、水相に脂溶性物質を配合したW/O/W型でもよい。可溶化又は乳化できる脂溶性物質は特に限定されないが、例えば、高級アルコール、エステル油、トリグリセリン、トコフェロール、高級脂肪酸、リン脂質等、さらに難溶性薬物、例えばアドレマイシン、シスプラチン、パクリタキセル、アンホテリシンB等が挙げられる。化粧品分野における分散剤としての使用形態も特に限定されないが、例えば、アスコルビン酸等の水溶性物質を脂質膜構造体の内水相に保持し、またはトコフェロール等の脂溶性物質を脂質二重膜に保持しておく場合などにおいて、本発明の化合物を脂質膜構造体形成剤として用いることにより、より安定に対象物質を水溶液中に分散できる。界面活性剤及び分散剤として用いる場合、添加量としては可溶化、分散、乳化などの対象となる物質の全重量に対して0.1～20重量%、好ましくは0.5～7重量%、より好ましくは0.5～5重量%である。

上記一般式(1)において $k_2$ が0である化合物は、特にノニオン界面活性剤として高塩濃度条件下で有効に使用することができる。一般に、ポリアルキレンオキシド修飾リン脂質等は、オキシアルキレン基に由来する親水性とアシル基に由来する疎水性とを有しているので界面活性剤として使用することができる。しかしながら、通常、ポリアルキレンオキシド修飾リン脂質に代表されるオキシアルキレン基を有する界面活性剤は高塩濃度条件下で使用する場合に濁りを生じる

という問題がある。その他、グリシドール誘導体のノニオン系界面活性剤を高塩濃度条件下で用いることについて報告があるが、その場合には残存するグリシジル化合物による皮膚刺激の問題等があり化粧品分野への応用には適さないという問題がある。上記一般式(1)においてQが水素原子である化合物は、塩濃度の高い状態においても高い可溶化能を維持できるという特徴があり、耐塩性に優れた界面活性剤として使用できる。また、化粧料の分野において皮膚との相溶性の高い界面活性剤として用いることができる。

上記一般式(1)において $k_3 < 1$ かつ $k_2 > k_3$ である化合物、すなわち分岐したオキシアルキレン基の末端にカルボキシル基を有する化合物は、pH感受性のリン脂質として、例えば分散剤として使用することができる。カチオン性の物質(例えばカチオン性の生理活性物質など)や塩基性物質などを水中に分散する場合、例えばカチオン性物質又は塩基性物質を含む微粒子等の表面を上記化合物で被覆することにより、水中に安定に分散することができる。本発明の化合物はポリアニオン性基を有するのでイオン結合により安定に分散することができる。Qが水素原子、 $k_2$ 及び $k_3$ がともに1以上存在する場合、カルボキシル基等と水酸基とが共存することになり、製造工程中に分子間での結合により架橋しゲル化を起こす場合がある。この理由から、アニオン性分散剤として使用する場合は、 $k_3$ が1より小さいことが好ましい。

上記一般式(1)で表される本発明の化合物は、リポソーム、エマルジョン、ミセル等の脂質膜構造体の構成リン脂質として用いることができる。本発明の化合物を用いることにより、脂質膜構造体、好ましくはリポソームの血中滞留時間を増大することができる。この効果は脂質膜構造体に本発明の化合物を少量添加することにより達成できる。いかなる特定の理論に拘泥するわけではないが、3以上の多分岐を有する本発明の化合物を脂質膜構造体の構成リン脂質として用いることにより、ポリオキシエチレン鎖が脂質膜構造体の膜中で三次元的な広がりをもつため、水溶液中での微粒子の凝集を防ぎ安定な分散状態が達成される。

脂質膜構造体中への本発明の化合物の配合量は、医薬の薬効を生体内で有効に

発現させるのに十分な量であればよく、特に限定されることはない。例えば、脂質膜構造体に保持させるべき医薬の種類、治療や予防などの用途、脂質膜構造体の形態などにより適宜選択可能である。本発明により提供される脂質膜構造体に保持される医薬の種類は特に限定されないが、例えば、抗腫瘍剤として用いられる化合物が好ましい。これら化合物としては、例えば、塩酸イリノテカン、塩酸ノギテカン、エキサテカン、RFS-2000、Lurtotecan、BNP-1350、Bay-383441、PNU-166148、IDEC-132、BN-80915、DB-38、DB-81、DB-90、DB-91、CKD-620、T-0128、ST-1480、ST-1481、DRF-1042、DE-310等のカンプトテシン誘導体、ドセタキセル水和物、パクリタキセル、IND-5109、BMS-184476、BMS-188797、T-3782、TAX-1011、SB-RA-31012、SBT-1514、DJ-927等のタキサン誘導体、イホスファミド、塩酸ニムスチン、カルボコン、シクロホスファミド、ダカルバジン、チオテパ、ブスルファン、メルファラン、ラニムスチン、リン酸エストラムスチンナトリウム、6-メルカプトプリンリボシド、エノシタビン、塩酸ゲムシタビン、カルモフル、シタラビン、シタラビンオクホスファート、テガフル、ドキシフルリジン、ヒドロキシカルバミド、フルオロウラシル、メトトレキサート、メルカプトプリン、リン酸フルダラビン、アクチノマイシンD、塩酸アクリラルビシン、塩酸イダルビシン、塩酸エビルビシン、塩酸ダウノルビシン、塩酸ドキソルビシン、塩酸ピラルビシン、塩酸ブレオマイシン、ジノスタチンスチマラマー、ネオカルチノスタチン、マイトマイシンC、硫酸ブレオマイシン、硫酸ペプロマイシン、エトポシド、酒石酸ビノレルビン、硫酸ピンクリスチン、硫酸ビンデシン、硫酸ビンブラスチン、塩酸アムルビシン、ゲフィニチブ、エキセメスタン、カペシタビン、TNP-470、TAK-165、KW-2401、KW-2170、KW-2871、KT-5555、KT-8391、TZT-1027、S-3304、CS-682、YM-511、YM-598、TAT-59、TAS-101、TAS-102、TA-106、



FK-228、FK-317、E7070、E7389、KRN-700、KRN-5500、J-107088、HMN-214、SM-11355、ZD-0473等を挙げることができる。

また、本発明の脂質膜構造体には遺伝子などを封入してもよい。遺伝子としては、オリゴヌクレオチド、DNAおよびRNAのいずれでもよく、特に形質転換等のイン・ビトロにおける導入用遺伝子や、イン・ビボで発現することにより作用する遺伝子、例えば、遺伝子治療用遺伝子、実験動物や家畜等の産業用動物の品種改良に用いられる遺伝子を挙げることができる。遺伝子治療用遺伝子としては、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アンチセンスDNA、アンチセンスRNA、酵素、サイトカイン等の生理活性物質をコードする遺伝子等を挙げることができる。

上記の脂質膜構造体には、本発明の化合物に加えて、さらにリン脂質、コレステロール、コレスタノール等のステロール類、その他の炭素数8～22の飽和及び不飽和のアシル基を有する脂肪酸類、 $\alpha$ -トコフェロール等の酸化防止剤を配合してもよい。リン脂質としては、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファリジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール、カルジオリピン、スフィンゴミエリン、セラミドホスホリルエタノールアミン、セラミドホスホリルグリセロール、セラミドホスホリルグリセロールホスファート、1,2-ジミリストイル-1,2-デオキシホスファチジルコリン、プラスマロゲンおよびホスファチジン酸等を挙げることができ、これらは1種または2種以上を組み合わせ用いることができる。これらのリン脂質の脂肪酸残基は特に限定されないが、例えば、炭素数12から20の飽和または不飽和の脂肪酸残基を挙げることができ、具体的には、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸等の脂肪酸由来のアシル基を挙げることができる。また、卵黄レシチン及び大豆レシチンのような天然物由来のリン脂質を用いることもできる。

本発明の化合物を含む脂質膜構造体の形態およびその製造方法は特に限定され

ないが、存在形態としては、例えば、乾燥した脂質混合物形態、水系溶媒に分散した形態、さらにこれを乾燥させた形態や凍結させた形態等を挙げることができる。乾燥した脂質混合物の形態の場合には、例えば、使用する脂質成分をいったんクロロホルム等の有機溶媒に溶解させ、次いでエバポレータによる減圧乾固や噴霧乾燥機による噴霧乾燥を行うことで製造することができる。脂質膜構造体が水系溶媒に分散した形態としては、一枚膜リポソーム、多重層リポソーム、O/W型エマルジョン、W/O/W型エマルジョン、球状ミセル、ひも状ミセル、不定型の層状構造物などを挙げることができるが、これらのうちリポソームが好ましい。分散した状態の脂質膜構造体の大きさは特に限定されないが、例えば、リポソームやエマルジョンの場合には粒子径が50 nmから5  $\mu$ mであり、球状ミセルの場合、粒子径が5 nmから100 nmである。ひも状ミセルや不定型の層状構造物の場合は、その1層あたりの厚みが5 nmから10 nmでこれらが層を形成していると考えればよい。

水系溶媒（分散媒）の組成も特に限定されず、例えば、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝化生理食塩液等の緩衝液、生理食塩水、細胞培養用の培地などであってもよい。本発明の化合物を水系溶媒に対して用いる場合、脂質膜構造体を安定に分散させることができるが、水のほかに、グルコース、乳糖、ショ糖などの糖水溶液、グリセリン、プロピレングリコールなどの多価アルコール水溶液等を加えてもよい。この水系溶媒に分散した脂質膜構造体を安定に長期間保存するには、凝集などの物理的安定性の面から、水系溶媒中の電解質を極力なくすことが望ましい。また、脂質の化学的安定性の面から、水系溶媒のpHを弱酸性から中性付近（pH 3.0から8.0）に設定したり、窒素バブリングにより溶存酸素を除去することが望ましい。さらに凍結乾燥保存や噴霧乾燥保存をする場合には、例えば糖水溶液を凍結保存するに際して糖水溶液や多価アルコール水溶液をそれぞれ用いると効果的な保存が可能である。これらの水系溶媒の濃度は特に限定されるべきものではないが、例えば、糖水溶液においては、2から20%（W/V）が好ましく、5から10%（W/V）がさらに好ましい。また、多

価アルコール水溶液においては、1 から 5 % (W/V) が好ましく、2 から 2.5 % (W/V) がさらに好ましい。緩衝液においては、緩衝剤の濃度が 5 から 50 mM が好ましく、10 から 20 mM がさらに好ましい。水系溶媒中の脂質膜構造体の濃度は特に限定されないが、脂質膜構造体における脂質総量の濃度は、0.1 mM から 500 mM が好ましく、1 mM から 100 mM がさらに好ましい。

脂質膜構造体が水系溶媒に分散した形態は、上記の乾燥した脂質混合物を水系溶媒に添加し、さらにホモジナイザー等の乳化機、超音波乳化機、高圧噴射乳化機等により乳化することで製造することができる。また、リポソームを製造する方法としてよく知られている方法、例えば逆相蒸発法などによっても製造することもでき、特に限定されるべきものではない。脂質膜構造体の大きさを制御したい場合には、孔径のそろったメンブランフィルター等を用いて、高圧下でエクストルージョン（押し出し濾過）を行えばよい。

上記の水系溶媒に分散した脂質膜構造体をさらに乾燥させる方法としては、通常の凍結乾燥や噴霧乾燥を挙げることができる。この時の水系溶媒としては、上記したように糖水溶液、好ましくはショ糖水溶液、乳糖水溶液を用いるとよい。水系溶媒に分散した脂質膜構造体をいったん製造した上でさらに乾燥すると、脂質膜構造体の長期保存が可能となるほか、この乾燥した脂質膜構造体に医薬水溶液を添加すると、効率よく脂質混合物が水和されるために医薬を効率よく脂質膜構造体に保持させることができるといったメリットがある。脂質膜構造体に医薬を添加することにより医薬組成物を製造することができ、該脂質膜構造体は疾病の治療および／または予防用の医薬組成物として用いることができる。医薬が遺伝子の場合は、遺伝子導入用キットとして用いることも可能である。

医薬組成物の形態としては、脂質膜構造体と医薬が混合された形態のほか、該脂質膜構造体に医薬が保持された形態でもよい。ここでいう保持とは、医薬が脂質膜構造体の膜の中、表面、内部、脂質層中、及び／又は脂質層の表面に存在することを意味する。医薬組成物の存在形態およびその製造方法は、脂質膜構造体と同様に特に限定されることはないが、例えば、存在形態としては、混合乾燥物

形態、水系溶媒に分散した形態、さらにこれを乾燥させた形態や凍結させた形態が挙げられる。

脂質類と医薬との混合乾燥物は、例えば、使用する脂質類成分と医薬とをいったんクロロホルム等の有機溶媒で溶解させ、次にこれをエバポレータによる減圧乾固や噴霧乾燥機による噴霧乾燥を行うことにより製造することができる。脂質膜構造体と医薬との混合物が水系溶媒に分散した形態としては、多重層リポソーム、一枚膜リポソーム、O/W型エマルジョン、W/O/W型エマルジョン、球状ミセル、ひも状ミセル、不定形の層状構造物などを挙げることができるが、特に限定されることはない。混合物としての大きさ（粒子径）や水系溶媒の組成なども特に限定されることはないが、例えばリポソームの場合には50 nm～2  $\mu$  m、球状ミセルの場合は5～100 nm、エマルジョンを形成する場合は50 nm～5  $\mu$  mである。混合物としての水系溶媒における濃度も特に限定はされない。なお、脂質膜構造体と医薬との混合物が水系溶媒に分散した形態の製造方法としてはいくつかの方法が知られており、通常は脂質膜構造体と医薬との混合物の存在様式に応じて下記のように適宜の製造方法を選択する必要がある。

#### 製造方法 1

上記の脂質類と医薬との混合乾燥物に水系溶媒を添加し、さらにホモジナイザー等の乳化機、超音波乳化機、高圧噴射乳化機等による乳化を行う方法である。大きさ（粒子径）を制御したい場合には、さらに孔径のそろったメンブランフィルターを用いて、高圧力下でエクストルージョン（押し出し慮過）を行えばよい。この方法の場合には、まず脂質類と医薬との混合乾燥物を作るために、医薬を有機溶媒に溶解する必要があるが、医薬と脂質膜構造体との相互作用を最大限に利用できるメリットがある。すなわち、脂質膜構造体が層状構造を有する場合にも、医薬は多重層の内部にまで入り込むことが可能であり、一般的にこの製造方法を用いると医薬の脂質膜構造体への保持率を高くすることができる。

## 製造方法 2

脂質類成分を有機溶媒でいったん溶解後、有機溶媒を留去した乾燥物に、さらに医薬を含む水系溶媒を添加して乳化する方法である。大きさ（粒子径）を制御したい場合には、さらに孔径のそろったメンブランフィルターを用いて、高圧力下でエクストルージョン（押し出し慮過）を行えばよい。有機溶媒には溶解しにくい、水系溶媒には溶解する医薬に適用できる。脂質膜構造体がリポソームの場合、内水相部分にも医薬を保持できる長所がある。

## 製造方法 3

水系溶媒に既に分散したリポソーム、エマルション、ミセル、又は層状構造物などの脂質膜構造体に、さらに医薬を含む水系溶媒を添加する方法である。この方法の適用は水溶性の医薬に限定される。既にできあがっている脂質膜構造体に外部から医薬を添加する方法であるため、医薬が高分子の場合には、医薬は脂質膜構造体内部には入り込めず、脂質膜構造体の表面に結合した存在様式をとる場合がある。脂質膜構造体としてリポソームを用いた場合、この製造方法 3 を用いると、医薬がリポソーム粒子同士の間挟まったサンドイッチ構造（一般的には複合体あるいはコンプレックスと呼ばれている。）をとることが知られている。この製造方法では、脂質膜構造体単独の水分散液をあらかじめ製造するため、乳化時の医薬の分解を考慮する必要がなく、大きさ（粒子径）の制御もたやすいので、製造方法 1 や製造方法 2 に比べて比較的製造が容易である。

## 製造方法 4

水系溶媒に分散した脂質膜構造体をいったん製造した上でさらに乾燥させた乾燥物に、さらに医薬を含む水系溶媒を添加する方法である。この場合も製造方法 3 と同様に医薬は水溶性のものに限定される。製造方法 3 と大きく違う点は、脂質膜構造体と医薬との存在様式にある。すなわち、この製造方法 4 では、水系溶媒に分散した脂質膜構造体をいったん製造した上でさらに乾燥させた乾燥物を製

造するために、この段階で脂質膜構造体は脂質膜の断片として固体状態で存在する。この脂質膜の断片を固体状態に存在させるために、前記したように水系溶媒として糖水溶液、好ましくはショ糖水溶液や乳糖水溶液を用いるのが好ましい。ここで、医薬を含む水系溶媒を添加すると、固体状態で存在していた脂質膜の断片は水の侵入とともに水和を速やかに始め、脂質膜構造体を再構成することができる。この時に、医薬が脂質膜構造体内部に保持された形態の構造体が製造できる。

製造方法3では、医薬が高分子の場合には、医薬は脂質膜構造体内部には入り込めず、脂質膜構造体の表面に結合した存在様式をとるが、製造方法4はこの点で大きく異なっている。この製造方法4は、脂質膜構造体単独の水分散液をあらかじめ製造するため、乳化時の医薬の分解を考慮する必要がなく、大きさ（粒子径）の制御もたやすいので、製造方法1や製造方法2に比べて比較的製造が容易であることが挙げられる。また、この他に、凍結乾燥あるいは噴霧乾燥を行うため、製剤としての保存安定性を保証しやすいこと、乾燥製剤を医薬水溶液で再水和しても大きさ（粒子径）を元にもどせること、高分子の医薬の場合でも脂質膜構造体内部に医薬を保持させやすいことなどが長所として挙げられる。

脂質膜構造体と医薬との混合物が水系溶媒に分散した形態を調製するための他の方法としては、リポソームを製造する方法としてよく知られる方法、例えば逆相蒸発法などを別途用いてもよい。大きさ（粒子径）を制御したい場合には、さらに孔径のそろったメンブランフィルターを用いて、高圧力下でエクストルージョン（押し出し慮過）を行えばよい。また、上記の脂質膜構造体と医薬との混合物が水系溶媒に分散した分散液をさらに乾燥させる方法としては、凍結乾燥や噴霧乾燥が挙げられる。この時の水系溶媒としては、脂質膜構造体単独の場合と同様に糖水溶液、好ましくはショ糖水溶液や乳糖水溶液を用いるとよい。上記の脂質膜構造体と医薬との混合物が水系溶媒に分散した分散液をさらに凍結させる方法としては、通常の凍結方法が挙げられるが、この時の水系溶媒としては、脂質

膜構造体単独の場合と同様に、糖水溶液や多価アルコール水溶液を用いるとよい。

医薬組成物において配合し得る脂質は、使用する医薬の種類などに応じて適宜選択すればよいが、例えば、医薬が遺伝子以外の場合には医薬1重量部に対して0.1から1000重量部が好ましく、0.5から200重量部がより好ましい。また、医薬が遺伝子の場合には、医薬（遺伝子）1  $\mu\text{g}$  に対して、1から500 nmolが好ましく、10から200 nmolがより好ましい。

本発明の化合物および医薬組成物の使用方法は、その使用形態にそって、適宜検討すればよい。ヒト等に対する投与手段は、特に限定されず、経口投与又は非経口投与のいずれでもよい。経口投与の剤形としては、例えば、錠剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤、カプセル剤、内服液剤等を挙げることができ、非経口投与の剤形としては、例えば、注射剤、点滴剤、点眼剤、軟膏剤、座剤、懸濁剤、パップ剤、ローション剤、エアゾール剤、プラスター剤等を挙げることができる。医薬の分野においては、これらのうち注射剤、点滴剤が好ましく、投与方法としては、静脈注射、皮下注射、皮内注射などのほか、標的とする細胞や臓器に対しての局所注射が好ましい。また、化粧料の分野においては、化粧料の形態としては、具体的には、ローション、クリーム、化粧水、乳液、フォーム剤、ファンデーション、口紅、パック剤、皮膚洗浄剤、シャンプー、リンス、コンディショナー、ヘアトニック、ヘアリキッド、ヘアクリーム等を挙げることができる。

医薬組成物の投与手段は特に限定されず、経口投与又は非経口投与のいずれでもよいが、非経口投与が好ましい。医薬組成物の形態も特に限定されないが、経口投与の剤形としては、例えば、錠剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤等を挙げることができ、非経口投与の剤形としては、例えば、注射剤、点滴剤、点眼剤、軟膏剤、坐剤等を挙げることができる。これらのうち注射剤又は点滴剤が好ましく、投与方法としては、静脈注射のほか、標的とする細胞や臓器に対しての局所注射が好ましい。

## 実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

### 合成例 1

ポリオキシエチレンペンタエリスリトールエーテル（平均分子量2000）ーモノジステアロイルホスファチジルエタノールアミンサクシネートの合成

ジステアロイルホスファチジルエタノールアミンサクシネートの調製

ジステアロイルホスファチジルエタノール748mg（1mmol）にクロロホルム50mLを加えて40℃で攪拌し、さらにトリエチルアミン100mg（1mmol）を添加しリン脂質クロロホルム溶液とした。その溶液に無水コハク酸105mg（1.05mmol）を加えて40℃で2時間反応を行った。反応終点は下記のTLCにより行い、ニンヒドリン発色にてジステアロイルホスファチジルエタノールが検出されなくなる点とした。冷却後ろ過して未反応のジステアロイルホスファチジルエタノールアミンを除去し、ろ液にアセトンを100mLを加えてジステアロイルホスファチジルエタノールアミンサクシネートの結晶805mgを得た。

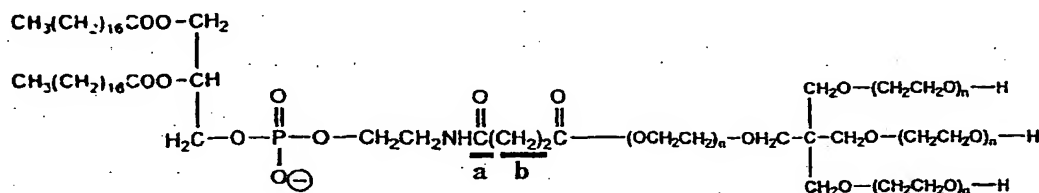
ポリオキシエチレンペンタエリスリトールエーテル（平均分子量2000）ーモノジステアロイルホスファチジルエタノールアミンサクシネートの合成

ポリオキシエチレンペンタエリスリトールエーテル（平均分子量2000、 $m=1.1$ ）2.1g（1.05mmol）にクロロホルム20mLを加えて溶解し、40℃に加温し均一にした後、上記（1）で得たジステアロイルホスファチジルエタノールアミンサクシネートをクロロホルム10mLに溶解し、トリエチルアミン100mg（1mmol）を加えて40℃に加温し均一にした溶液を加え、そこにN-ヒドロキシコハク酸イミド1.24g（0.011mol）及びジシクロヘキシルカルボジイミド4.25g（0.021mol）を添加して室温で6時間反応を行った。反応後エバポレーターにて脱溶剤し、トルエン10mL及



びヘキサン50 mLを加えて、ポリオキシエチレンペンタエリスリトールエーテルモノージステアロイルホスファジルエタノールアミンサクシネートの結晶を得た。その結晶に酢酸エチル20 mLを添加して40℃で加温溶解した後、ヘキサン20 mLを加えて攪拌後10℃以下に冷却し、ペンタエリスリトールポリオキシエチレンモノージステアロイルホスファジルエタノールアミンサクシネート1.8 gを得た。

反応の進行及び生成物の同定は、シリカゲルプレートを用いた薄層クロマトグラフィー (TLC) によって行った。展開溶媒にはクロロホルムとメタノールの混合比が85:15体積比の混合溶媒を用い、ヨウ素蒸気にて発色させて既知量の標準物質との比較により含有物質の定量を行った。反応終点は下記のTLCにてR<sub>f</sub>値0.6~0.7付近に検出されるポリオキシエチレンペンタエリスリトールエーテル (平均分子量2000) のスポットが、リン脂質化合物が結合することによりR<sub>f</sub>0.4~0.5付近に検出されるスポットに変換したことにより確認を行った。生成物の確認は、IRスペクトルにおいて、ホスファチジルエタノールアミン中のアミノ基 (3000 cm<sup>-1</sup>) のピークがアミド結合することにより、カルボニル基 (a; 1700 cm<sup>-1</sup>) のピークに変ることにより、また<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz、CDCl<sub>3</sub>) よりサクシネート (b) δ: 2.75 ppm (2H, t)、2.95 ppm (2H, t) の検出により確認した。さらに、<sup>1</sup>H-NMRによりジステアロイルホスファチジルアミンのアシル基末端のメチル基 δ: 0.9 ppm (6H, t)、アシル基中のメチレン基 δ: 1.25 ppm付近、ポリオキシエチレン基 δ: 3.5 ppm付近の検出により、リン脂質及びオキシエチレン鎖の存在を確認した。



## 合成例 2

ポリオキシエチレンジグリセロールエーテル（平均分子量5000）ーモノージステアロイルホスファジルエタノールアミングルタレートの合成

## (1) ジステアロイルホスファチジルエタノールアミングルタレートの調製

ジステアロイルホスファチジルエタノール748mg（1mmol）にクロロホルム50mLを加えて40℃で攪拌し、さらにトリエチルアミン100mg（1mmol）を添加しリン脂質クロロホルム溶液とした。その溶液に無水グルタル酸138.6mg（1.05mmol）を加えて40℃で2時間反応を行った。反応終点は下記のTLCにより行い、ニンヒドリン発色にてジステアロイルホスファチジルエタノールが検出されなくなる点とした。冷却後ろ過して未反応のジステアロイルホスファチジルエタノールアミンを除去し、ろ液にアセトンを100mLを加えてジステアロイルホスファチジルエタノールアミングルタレートの結晶835mgを得た。

## (2) ポリオキシエチレンジグリセロールエーテル（平均分子量5000）ーモノージステアロイルホスファジルエタノールアミングルタレートの合成

ポリオキシエチレンジグリセロールエーテル（平均分子量5000、 $m=28$ ）5.25g（1.05mmol）にクロロホルム40mLを加えて溶解し、40℃に加温し均一にした後、合成例1と同様にして得たジステアロイルホスファチジルエタノールアミンサクシネートをクロロホルム10mLに溶解し、トリエチルアミン100mg（1mmol）を加えて、合成例1と同様に反応及び精製を行いポリオキシエチレンジグリセロールエーテルーモノージステアロイルホスファジルエタノールアミンサクシネート4.0gを得た。

反応の進行及び生成物の同定は、合成1と同様に薄層クロマトグラフィー（TLC）によって行った。反応終点は下記のTLCにてRf値0.6～0.7付近に検出されるポリオキシエチレンジグリセロールエーテル（平均分子量5000）のスポットが、リン脂質化合物が結合することによりRf0.4～0.5付近に検出されるスポットに変換したことにより確認を行った。生成物の確認は、I

R スペクトルにおいて、ホスファチジルエタノールアミン中のアミノ基 ( $3000\text{ cm}^{-1}$ ) のピークがアミド結合することにより、カルボニル基 ( $1700\text{ cm}^{-1}$ ) のピークに変ることにより、また  $^1\text{H-NMR}$  ( $400\text{ MHz}$ ,  $\text{CDCl}_3$ ) よりサクシネート ( $-\text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}-$ )  $\delta$ :  $2.7\text{ ppm}$  ( $2\text{ H}$ , t)、 $2.9\text{ ppm}$  ( $2\text{ H}$ , t) の検出により確認した。さらに、 $^1\text{H-NMR}$ によりジステアロイルホスファチジルアミンのアシル基末端のメチル基  $\delta$ :  $0.9\text{ ppm}$  ( $6\text{ H}$ , t)、アシル基中のメチレン基  $\delta$ :  $1.25\text{ ppm}$  付近、ポリオキシエチレン基  $\delta$ :  $3.5\text{ ppm}$  付近の検出により、リン脂質及びオキシエチレン鎖の存在を確認した。

### 合成例 3

ポリオキシエチレンヘキサグリセロールエーテル（平均分子量2000）-モノ  
ージステアロイルホスファジルエタノールアミンサクシネートの合成

ポリオキシエチレンヘキサグリセロールエーテル（平均分子量2000、 $m=6$ ）2.1g（1.05mol）にクロロホルム20mLを加えて溶解し、40℃に加温し均一にした後、合成例1と同様にして得たジステアロイルホスファチジルエタノールアミンサクシネートをクロロホルム10mLに溶解し、トリエチルアミン100mg（1mmol）を加えて、合成例1と同様にしてポリオキシエチレンヘキサグリセロールエーテルモノジステアロイルホスファチジルエタノールアミンサクシネート1.1gを得た。

反応の進行及び生成物の同定は、合成1と同様に薄層クロマトグラフィー（TLC）によって行った。反応終点は下記のTLCにてRf値0.6～0.7付近に検出されるポリオキシエチレンヘキサグリセロールエーテル（平均分子量2000）のスポットが、リン脂質化合物が結合することによりRf0.4～0.5付近に検出されるスポットに変換したことにより確認を行った。生成物の確認は、IRスペクトルにおいて、ホスファチジルエタノールアミン中のアミノ基（ $3000\text{ cm}^{-1}$ ）のピークがアミド結合することにより、カルボニル基（ $1700\text{ cm}^{-1}$ ）のピークが消失することを確認した。

$\text{m}^{-1}$ ) のピークに変わることにより、また $^1\text{H-NMR}$  ( $400\text{MHz}$ 、 $\text{CDCl}_3$ ) よりサクシネート ( $-\text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}-$ )  $\delta: 2.7\text{ppm}$  (2H, t)、 $2.9\text{ppm}$  (2H, t) の検出により確認した。さらに、 $^1\text{H-NMR}$  よりジステアロイルホスファチジルアミンのアシル基末端のメチル基  $\delta: 0.9\text{ppm}$  (6H, t)、アシル基中のメチレン基  $\delta: 1.25\text{ppm}$  付近、ポリオキシエチレン基  $\delta: 3.5\text{ppm}$  付近の検出により、リン脂質及びオキシエチレン鎖の存在を確認した。

#### 合成例 4

ポリオキシエチレングリセロールエーテル (平均分子量 2000) -モノ-ジステアロイルホスファチジルエタノールアミンサクシネートの合成

ポリオキシエチレングリセロールエーテル (平均分子量 2000、 $m=15$ ) 2.1g ( $1.05\text{mmol}$ ) にクロロホルム 20mL を加えて溶解し、 $40^\circ\text{C}$  に加温し均一にした後、合成例 1 と同様にして得たジステアロイルホスファチジルエタノールアミンサクシネートをクロロホルム 10mL に溶解し、トリエチルアミン 100mg ( $1\text{mmol}$ ) を加えて、合成例 1 と同様にしてポリオキシエチレングリセロールエーテル-モノ-ジステアロイルホスファチジルエタノールアミンサクシネート 1.9g を得た。

反応の進行及び生成物の同定は、合成 1 と同様に薄層クロマトグラフィー (TLC) によって行った。反応終点は下記の TLC にて  $R_f$  値 0.6~0.7 付近に検出されるポリオキシエチレングリセロールエーテル (平均分子量 2000) のスポットが、リン脂質化合物が結合することにより  $R_f$  0.4~0.5 付近に検出されるスポットに変換したことにより確認を行った。生成物の確認は、IR スペクトルにおいて、ホスファチジルエタノールアミン中のアミノ基 ( $3000\text{cm}^{-1}$ ) のピークがアミド結合することにより、カルボニル基 ( $1700\text{cm}^{-1}$ ) のピークに変わることにより、また $^1\text{H-NMR}$  ( $400\text{MHz}$ 、 $\text{CDCl}_3$ ) よりサクシネート ( $-\text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}-$ )  $\delta: 2.7\text{ppm}$  (2H, t

)、2.9 ppm (2H, t) の検出により確認した。さらに、<sup>1</sup>H-NMRによりジステアロイルホスファチジルアミンのアシル基末端のメチル基  $\delta$ : 0.9 ppm (6H, t)、アシル基中のメチレン基  $\delta$ : 1.25 ppm 付近、ポリオキシエチレン基  $\delta$ : 3.5 ppm 付近の検出により、リン脂質及びオキシエチレン鎖の存在を確認した。

#### 合成例 5

ポリオキシエチレンペンタエリスリトールエーテル (分子量5000) グルタリルモノジステアロイルホスファチジルエタノールアミンの合成

(1) ポリオキシエチレンペンタエリスリトールエーテル (分子量5000) グルタレート

ポリオキシエチレンペンタエリスリトールエーテル (分子量5000、 $m=2$ ) 5 g (1 mmol) に酢酸ナトリウムを3.3 mg (0.04 mmol) を加えて、100℃に加温し均一にした後、無水グルタル酸を0.11 g (1.1 mmol) 加え、110℃で8時間反応を行った。冷却後イソプロピルアルコール20 mLを加えて、ポリオキシエチレンペンタエリスリトールエーテル (分子量5000) グルタレートの結晶を得た。その結晶にクロロホルム15 mLを添加して40℃で加温溶解した後、N-ヒドロキシコハク酸イミド0.12 g (1.1 mmol) 及びジシクロヘキシルカルボジイミド0.43 g (2.1 mmol) を添加し、40℃で2時間反応した。反応後濾過し、粗ポリオキシエチレンペンタエリスリトールエーテル (分子量5000) サクシンイミジルグルタレート溶液を得た。

(2) ポリオキシエチレンペンタエリスリトールエーテル (分子量5000) グルタリルモノジステアロイルホスファチジルエタノールアミンの合成

ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン1.5 g (2 mmol) にクロロホルム7 mLを加えて40℃に加温しリン脂質クロロホルム溶液を得た。またトリエチルアミン0.2 g (2 mmol) を添加し40℃で攪拌した。このリ

ン脂質溶液に上記のポリオキシエチレンペンタエリスリトールエーテル（分子量 5000）サクシンイミジルグルタレート溶液を徐々添加し、40℃で5時間反応を行った。反応後エバポレーターにて脱溶剤し、トルエン20mL添加し加温溶解した後ヘキサンを40mL添加して攪拌し結晶を析出させた。この結晶を濾過にて得た。得られた粗結晶を酢酸エチル15mLに50℃で加温溶解し、吸着剤としてキョーワード700及びキョーワード1000（協和化学工業株式会社製）をそれぞれ0.1g加えて30分間攪拌した。吸引濾過にてキョーワードを除去し、得られたろ液にヘキサン10mLを添加して15℃以下に冷却し結晶析出させた。この結晶を濾過により得た。得られた結晶に酢酸エチル30mLを加えて50℃に加温して溶解し、その後15℃以下に冷却し、結晶を析出させた。この結晶を濾過して採取した。加温溶解時に不溶物がある場合は、濾過にて除去し次の工程に進んだ。さらに得られた結晶を再度同様に酢酸エチル20mLに加温溶解し、ヘキサン10mLを加えて析出した結晶を濾過して最終純度98%の結晶5gを得られ収率は94.5%であった。

反応終点は下記のTLCにてRf値0.7～0.8付近に検出されるポリオキシエチレンペンタエリスリトールエーテル（分子量5000）サクシンイミジルグルタレートのスポットが、リン脂質化合物結合によりRf0.2～0.3付近に検出されるスポットに変換したことにより確認を行った。生成物の確認は、IRスペクトルにおいて、ホスファチジルエタノールアミン中のアミノ基（3000  $\text{cm}^{-1}$ ）のピークがアミド結合することにより、カルボニル基（c；1700  $\text{cm}^{-1}$ ）のピークに変ることにより、また $^1\text{H-NMR}$ （400MHz、 $\text{CDCl}_3$ ）よりグルタレート（d： $-\text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}-$ ） $\delta$ ：2.0ppm（8H、m）、2.5ppm（8H、t）、2.7ppm（8H、t）の検出により確認した。さらに、 $^1\text{H-NMR}$ によりジステアロイルホスファチジルアミンのアシル基末端のメチル基  $\delta$ ：0.9ppm（6H、t）、アシル基中のメチレン基  $\delta$ ：1.25ppm付近、ポリオキシエチレン基  $\delta$ ：3.5ppm付近の検出により、リン脂質及びオキシエチレン鎖の存在を確認した。

$$\begin{array}{c}
 \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COO}-\text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COO}-\text{CH} \\
 | \\
 \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{O}^-)-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{CH}_2)_3\text{C}(=\text{O})-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_3\text{COH})_2-\text{CH}_2\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_3\text{COH} \\
 | \\
 \text{O}^-
 \end{array}$$

ポリオキシエチレンヘキサグリセリンエーテル(分子量2000、 $m=6$ ) 2 g (1 mmol)を用いて、合成例5と同様に無水グルタル酸を反応させてポリオキシエチレンヘキサグリセリンエーテル(分子量2000)グルタレートを得、さらにN-ヒドロキシコハク酸イミド0.12 g (1.1 mmol)及びジシクロヘキシルカルボジイミド0.43 g (2.1 mmol)と反応し下記式(6)

で示される粗ポリオキシエチレンヘキサグリセリンエーテル (分子量 2000) サクシンイミジルグルタレート 1.9 g を得た。

(2) ポリオキシエチレンヘキサグリセリンエーテル (分子量 2000) グルタルルーモノジステアロイルホスファチジルエタノールアミンの合成

ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン 1.5 g (2 mmol) を用いて、合成例 5 と同様に粗ポリオキシエチレンヘキサグリセリンエーテル (分子量 2000) サクシンイミジルグルタレートと反応を行い、さらに精製してポリオキシエチレンヘキサグリセリンエーテル (分子量 2000) グルタルルーモノジステアロイルホスファチジルエタノールアミン 2.2 g を得た。

反応終点は下記の TLC にて R<sub>f</sub> 値 0.7 ~ 0.8 付近に検出される粗ポリオキシエチレンヘキサグリセリンエーテル (分子量 2000) サクシンイミジルグルタレートのスポットが、リン脂質化合物結合により R<sub>f</sub> 0.2 ~ 0.3 付近に検出されるスポットに変換したことにより確認を行った。生成物の確認は、IR スペクトルにおいて、ホスファチジルエタノールアミン中のアミノ基 (3000 cm<sup>-1</sup>) のピークがアミド結合することにより、カルボニル基 (c; 1700 cm<sup>-1</sup>) のピークに変ることにより、また <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) よりグルタレート (-OCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-) δ: 2.0 ppm (8H, m)、2.5 ppm (8H, t)、2.7 ppm (8H, t) の検出により確認した。さらに、<sup>1</sup>H-NMR によりジステアロイルホスファチジルアミンのアシル基末端のメチル基 δ: 0.9 ppm (6H, t)、アシル基中のメチレン基 δ: 1.25 ppm 付近、ポリオキシエチレン基 δ: 3.5 ppm 付近の検出により、リン脂質及びオキシエチレン鎖の存在を確認した。また、原料として用いたポリオキシエチレンヘキサグリセリンエーテルの水酸基価が 221 mg KOH/g であることより、分子量が約 2000 の 8 分岐したポリオキシエチレンであることを確認した。



## 合成例 7

ポリオキシエチレンペンタエリスリトールエーテル（分子量2000）サクシニルーモノジステアロイルホスファチジルエタノールアミンの合成

（1）ポリオキシエチレンペンタエリスリトールエーテル（分子量2000）サクシネートの合成

ポリオキシエチレンペンタエリスリトールエーテル（分子量2000、 $m=1$ ）2 g（1 mmol）に酢酸ナトリウムを3.3 mg（0.04 mmol）を加えて、100℃に加温し均一にした後、無水コハク酸を0.11 g（1.1 mmol）加え、110℃で5時間反応を行った。冷却後イソプロピルアルコール20 mLを加えて、ポリオキシエチレンペンタエリスリトールエーテル（分子量2000）サクシネートの結晶を得た。その結晶にクロロホルム15 mLを添加して40℃で加温溶解した後、N-ヒドロキシコハク酸イミド0.12 g（1.1 mmol）及びジシクロヘキシルカルボジイミド0.43 g（2.1 mmol）を添加し、40℃で2時間反応した。反応後濾過し、粗ポリオキシエチレンペンタエリスリトールエーテル（分子量2000）サクシンイミジルサクシネート溶液を得た。

（2）ポリオキシエチレンペンタエリスリトールエーテル（分子量2000）サクシニルーモノジステアロイルホスファチジルエタノールアミンの合成

ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン1.5 g（2 mmol）にクロロホルム7 mLを加えて40℃に加温しリン脂質クロロホルム溶液を得た。またトリエチルアミン0.2 g（2 mmol）を添加し40℃で攪拌した。このリン脂質溶液に上記の粗ポリオキシエチレンペンタエリスリトールエーテル（分子量2000）サクシンイミジルサクシネート溶液を徐々添加し、40℃で5時間反応を行った。反応後エバポレーターにて脱溶剤し、トルエン20 mL添加し加温溶解した後ヘキサンを40 mL添加して攪拌し結晶を析出させた。この結晶を濾過にて得た。得られた粗結晶を酢酸エチル15 mLに50℃で加温溶解し、吸着剤としてキョーワード700及びキョーワード1000をそれぞれ0.1 g加

えて30分間攪拌した。吸引濾過にてキョーワードを除去し、得られたろ液にヘキサン10mLを添加して15℃以下に冷却し結晶析出させた。この結晶を濾過により得た。得られた結晶に酢酸エチル30mLを加えて50℃に加温して溶解し、その後15℃以下に冷却し、結晶を析出させた。この結晶を濾過して採取した。加温溶解時に不溶物がある場合は、濾過にて除去し次の工程に進んだ。さらに得られた結晶を再度同様に酢酸エチル20mLに加温溶解し、ヘキサン10mLを加えて析出した結晶を濾過して最終純度98%の結晶5gを得られ収率は94.5%であった。

反応終点は下記のTLCにてRf値0.7~0.8付近に検出される粗ポリオキシエチレンペンタエリスリトールエーテル(分子量2000)サクシンイミジルサクシネートのスポットが、リン脂質化合物結合によりRf0.2~0.3付近に検出されるスポットに変換したことにより確認を行った。生成物の確認は、IRスペクトルにおいて、ホスファチジルエタノールアミン中のアミノ基( $3000\text{ cm}^{-1}$ )のピークがアミド結合することにより、カルボニル基( $c; 1700\text{ cm}^{-1}$ )のピークに変ることにより、また $^1\text{H-NMR}$ (400MHz、 $\text{CDCl}_3$ )よりサクシネート(b)  $\delta: 2.75\text{ ppm}$ (2H, t)、 $2.95\text{ ppm}$ (2H, t)の検出により確認した。さらに、 $^1\text{H-NMR}$ によりジステアロイルホスファチジルアミンのアシル基末端のメチル基  $\delta: 0.9\text{ ppm}$ (6H, t)、アシル基中のメチレン基  $\delta: 1.25\text{ ppm}$ 付近、ポリオキシエチレン基  $\delta: 3.5\text{ ppm}$ 付近の検出により、リン脂質及びオキシエチレン鎖の存在を確認した。

また、原料として用いたポリオキシエチレンペンタエリスリトールエーテルの水酸基価が26.7mg KOH/gであり、またゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)による測定より、ポリオキシエチレンペンタエリスリトールエーテル(分子量2000)サクシンイミジルサクシネートの分子量が2082であることより、分子量が約2000の4分岐したポリオキシエチレンであることを確認した。GPCには、システムとしてSHODEX GPC SYSTEM-11、

示差屈折率計としてSHODEX RI-71、カラムとしてSHODEX KF804Lを3本連続装着し、カラム温度40℃、展開溶剤としてテトラヒドロフランを1ml/分の流速で流し、得られたサンプルの0.1重量%テトラヒドロフラン溶液0.1mlを注入し、BORWIN GPC計算プログラムを用いて分子量計算を行った。

#### 実施例1：化粧水の調製（可溶化剤としての評価）

合成例5のポリオキシエチレンペンタエリスリトールエーテル（分子量5000）グルタリルモノジステアロイルホスファチジルエタノールアミンを使用して化粧水を作製した。すなわち、表1の組成からなる基材のうち精製水にグリセリン、プロピレングリコールを加え均一に溶解した。その他の基材をエタノールに加え均一にした後、前述の精製水相部に攪拌しながら添加し可溶化し化粧水を得た。

#### 配合例：

プロピレングリコール	5.0wt%
グリセリン	2.0wt%
オレイルアルコール	0.5wt%
大豆水添レシチン	0.5wt%
エタノール	7.0wt%
ポリオキシエチレンペンタエリスリトール エーテル（分子量5000）グルタリル モノジステアロイルホスファチジルエタノ ールアミン	2.0wt%
トコフェロール	0.02wt%
香料	適量
防腐剤	適量
精製水	73.0wt%

## 実施例 2 : リポソーム乳液の調製 (化粧品用分散剤としての評価)

## リポソーム調製法

大豆水添ホスファチジルコリン 645mg、コレステロール 299mg 及びミリスチン酸 23mg (モル比 1 : 1 : 0.1) 及びポリオキシエチレンペンタエリスリトールエーテル (分子量 5000) グルタレートを混合脂質濃度 5 モル%となるように加えて、予め 60℃ に加温した生理食塩水 10 ~ 11 mL を混合脂質濃度 10 重量%となるよう加えて攪拌し、さらに 60℃ の水浴中でホモゲナイザーにて 10 分間混合しリポソーム溶液を得た。そのリポソーム溶液を用いて表 2 の組成からなる基材のうち乳化剤を含む油相部を 60℃ に加温し均一に溶解した後、攪拌しながら水相部を同温度で添加しリポソーム乳液を得た。

## 油相部 :

セタノール	2.0 wt %
ワセリン	2.0 wt %
スクワラン	5.0 wt %
流動パラフィン	10.0 wt %
ポリオキシエチレンモノオレイン酸エステル	2.0 wt %
トコフェロール	0.02 wt %
香料	適量
防腐剤	適量

## 水相部 :

プロピレングリコール	2.0 wt %
精製水	67.0 wt %
リポソーム溶液	10.0 wt %

## 比較合成例 1

(1) モノメチルポリオキシエチレンカルバミル (分子量 2000) ジステアロイルホスファチジルエタノールアミンの合成

モノメトキシポリオキシエチレン（分子量2000）（20g、10mmol）にトルエン（80mL）を加え、110℃に昇温、還流し、脱水した。1,1'-カルボニルジイミダゾール（1.95g、12mmol）を加え、40℃で、2時間反応させた。ピリジン（1.58g、20mmol）、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（7g、9.36mmol）を加え、65℃で5時間反応させた。反応液にヘキサン（300mL）を入れ、結晶化させた。結晶に酢酸エチル（400mL）を加え、65℃で溶解し30分攪拌後、5℃に冷却した。析出した結晶を濾過した。同様に酢酸エチルでの工程を1回おこなった。

結晶を酢酸エチル（400mL）にて溶解し、吸着剤としてキョーワード700を1g加え、65℃にて1時間攪拌した。濾過後、5℃に冷却し結晶化させた。ヘキサン（200mL）にて結晶洗浄後、濾過、乾燥し、純度は98.3%のモノメチルポリオキシエチレンカルバミル（分子量2000）ジステアロイルホスファチジルエタノールアミンを15.3g（収率54.7%）を得た。

生成物の分析は、シリカゲルプレートを用いた薄層クロマトグラフィー（TLC）により行った。展開溶媒にはクロロホルムとメタノールの混合比が85：15重量比の混合溶媒を用い、ヨウ素蒸気にて発色させて既知量の標準物質との比較により含有物質の定性定量を行った。

### 実施例3：耐塩効果の測定（界面活性剤としての評価）

合成例1で得たポリオキシエチレンペンタエリスリトールエーテル（平均分子量2000）-モノ-ジステアロイルホスファチジルエタノールアミンについて、硫酸ナトリウム5重量%の水溶液に1重量%溶解した時の曇点を測定した。測定した結果80℃まで温度を上げても曇点を検出することはできなかった。

### 比較例1：耐塩効果の比較（界面活性剤としての評価）

比較合成例1で得たモノメチルポリオキシエチレンカルバミル（分子量2000）ジステアロイルホスファチジルエタノールアミンについて、実施例3と同様

にして曇点の測定を行った。測定した結果曇点は50.0℃であった。この結果により、分岐型ポリオキシエチレンリン脂質誘導体は高い耐塩性を示すことが分かった。

#### 実施例4：血中滞留性リポソームとしての評価

##### (1) リポソームの調製

表1に示した膜組成比率(処方例1~4、対照例1~2)の脂質を各々秤取し、クロロホルム・メタノール混液(2:1)に溶解させた後、エバポレーターにより有機溶媒を留去し、さらに1時間減圧乾固させた。次に、この脂質乾燥物(リピドフィルム)に、予め65℃に加温しておいた155mM硫酸アンモニウム水溶液(pH5.5)10mlを加え、湯浴につけながらボルテックスミキサーにて軽く攪拌した(ナスフラスコから脂質が剥がれる程度まで)。この脂質分散液をホモジナイザーに移して、10strokeホモジナイズした後、種々孔径のポリカーボネートメンブレンフィルターを用いてサイジング(0.2 $\mu$ m $\times$ 3回、0.1 $\mu$ m $\times$ 3回、0.05 $\mu$ m $\times$ 3回及び0.03 $\mu$ m $\times$ 3回)を行い、粒子径100nm前後の空リポソーム分散液を調製した。

この空リポソーム分散液4mlを生理食塩水で2.5倍希釈し、この希釈したリポソーム分散液を超遠心用チューブに入れ、65000rpmで1時間遠心分離した後、上清を捨て、生理食塩水で遠心前のリポソーム分散液量10mlになるように再懸濁させた(この時点で、トータル脂質濃度として50mMとなるよう調整した)。上記の外水相を生理食塩水に置換した空リポソーム分散液(トータル脂質濃度50mM)及びドキシソルビシン溶液(医薬濃度:3.3mg/ml生理食塩水)を予め60℃に加温しておき、容量比で空リポソーム分散液4に対しドキシソルビシン溶液6を加えた後(即ち、最終医薬濃度は2.0mg/ml、最終脂質濃度は20mM)、1時間、60℃でインキュベートした。次いで、これを室温にて冷却し、ドキシソルビシン含有リポソーム分散液とした。

##### (2) リポソームの物性

ドキシソルビシンのリポソームへの保持率は、上記リポソーム分散液の一部を取ってゲル濾過（セファデックスG-50；移動相は生理食塩水）を行い、ボイドボリュームに溶出したリポソーム分画中のドキシソルビシンを液体クロマトグラフィーにて定量することにより求めた。また粒子径は、上記リポソーム分散液の一部を取って準弾性光散乱（QELS）法にて測定した。その結果、表1に示すように、処方例4以外のリポソームでは、主薬ドキシソルビシンの保持率は100%であったため、元のリポソーム分散液をそのまま用い、以下に示すラットでの血中滞留性実験用に生理食塩水にて4/3倍希釈した（したがって、最終医薬濃度は1.5mg/ml、最終脂質濃度は15mM）。また、処方例4のリポソームは、超遠心分離（65000rpm、1時間）操作を行い、上清の未封入医薬を除去した後、生理食塩水にて最終医薬濃度が1.5mg/mlとなるように調製した（したがって、最終脂質濃度は約20.0mM）。なお、いずれのリポソームも、その粒子径は100nm前後であった。

### （3）ラットでの血中滞留性実験

処方例1～4、対照例1～2を用いて、SD系雄性ラット（6週令）における血中滞留性実験を行った。エーテル麻酔下でラット頸静脈より各リポソーム分散液を投与し（1群5匹；投与量は7.5mgドキシソルビシン/5ml/kg）、その後、各採血時点（2、4、8、24、48、72、120、168時間）でエーテル麻酔下、頸静脈よりヘパリン採血（0.5mlから1ml）を行い血漿分離を行った。その後、常法に従い、前処理してHPLC法にて血漿中の医薬濃度を測定した。各リポソーム分散液処方の血漿中医薬濃度から台形法にてAUC（0～∞）を算出した。表1に示すように、対照例1の本発明の脂質誘導体を含まないリポソーム、あるいは対照例2の本発明脂質誘導体のリン脂質部分（DSPe；ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン）のみを添加したリポソームのAUCに比して、本発明の脂質誘導体を含むリポソーム処方（処方例1～4）では1オーダー以上大きなAUCが得られ、明らかな血中滞留性が認められた。

表 1

	リポソーム膜組成	粒子径 (nm)	主薬保持率 (%)	AUC <sub>0-∞</sub> ±S. D. (μg·hr/mL)
処方例 1	DSPE-GLY20H/HSPC/Cholesterol= 1.04 mM/11.28 mM/7.68 mM ※DSPE-GLY20H: 合成例 4 により合成した。 HSPC: 水素添加大豆ホスファチジルコリン	88	100.0	3185±662
処方例 2	DSPE-PTE20H/HSPC/Cholesterol= 1.04 mM/11.28 mM/7.68 mM ※DSPE-PTE20H: 合成例 1 により合成した。 HSPC: 水素添加大豆ホスファチジルコリン	108	100.0	6584±739
処方例 3	DSPE-HGE020H/HSPC/Cholesterol= 1.04 mM/11.28 mM/7.68 mM ※DSPE-HGE020H: 合成例 3 により合成した。 HSPC: 水素添加大豆ホスファチジルコリン	101	100.0	6028±699
処方例 4	DSPE-PTESA20H/HSPC/Cholesterol= 1.04 mM/11.28 mM/7.68 mM ※DSPE-PTESA20H: 合成例 7 により合成した。 HSPC: 水素添加大豆ホスファチジルコリン	68	74.8	4300±494
対照例 1	HSPC/Cholesterol= 11.90 mM/8.10 mM ※HSPC: 水素添加大豆ホスファチジルコリン	91	100.0	452±98
対照例 2	DSPE/HSPC/Cholesterol= 1.04 mM/11.28 mM/7.68 mM ※DSPE: ジステアロイルホスファチジルコリン HSPC: 水素添加大豆ホスファチジルコリン	94	100.0	397±133

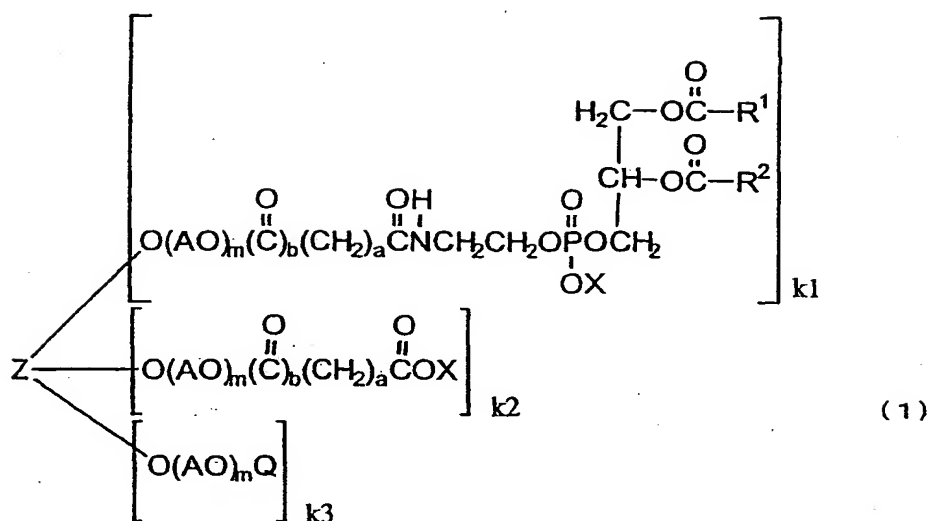
## 産業上の利用可能性

本発明のリン脂質誘導体は生体に対して安全性が高く、化粧料の分野などにおける界面活性剤、可溶化剤、又は分散剤として有用である。多分岐型ポリオキシエチレン誘導体である本発明のリン脂質誘導体をリポソームなどの脂質膜構造体の製造のために用いると、脂質膜構造体を不安定にすることなく、水系媒体中での微粒子の凝集を防ぎ、安定な溶液状態が得られる。さらに、本発明のリン脂質誘導体を含むリポソームは血中滞留性に優れているという特徴がある。



## 請求の範囲

## 1. 下記の一般式 (1) :



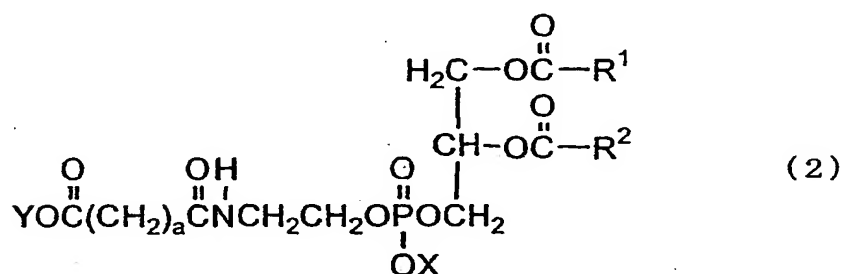
(式中、Zは3～10個の水酸基をもつ化合物の残基を示し；AOは炭素数2～4のオキシアルキレン基を示し；R<sup>1</sup>CO及びR<sup>2</sup>COはそれぞれ独立に炭素数8～22のアシル基を示し；Xは水素原子、アルカリ金属原子、アンモニウム、又は有機アンモニウムを示し；aは0～4の整数を示し；bは0又は1を示し；Qは水素原子又はメチル基を示し；mはオキシアルキレン基の平均付加モル数を示し；m、k<sub>1</sub>、k<sub>2</sub>、及びk<sub>3</sub>は下記の条件：3 ≤ m ≤ 200、9 ≤ m × (k<sub>1</sub> + k<sub>2</sub> + k<sub>3</sub>) ≤ 1000、1 ≤ k<sub>1</sub> ≤ 2、0 ≤ k<sub>2</sub> ≤ 9、及び0 ≤ k<sub>3</sub> ≤ 9であり、かつ3 ≤ k<sub>1</sub> + k<sub>2</sub> + k<sub>3</sub> ≤ 10を満足する数である) で表されるリン脂質誘導体。

2. 4 ≤ k<sub>1</sub> + k<sub>2</sub> + k<sub>3</sub> ≤ 8である請求の範囲第1項に記載のリン脂質誘導体。

3. R<sup>1</sup>CO及びR<sup>2</sup>COがそれぞれ独立に炭素数12～20のアシル基である請求の範囲第1項又は第2項に記載のリン脂質誘導体。

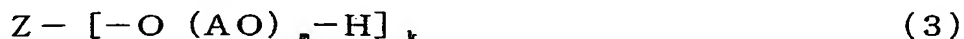
4. k<sub>2</sub>が0である請求の範囲第1項ないし第3項のいずれか1項に記載のリン脂質誘導体。

5. a 及び b が 0 である請求の範囲第 4 項に記載のリン脂質誘導体。
6.  $k_3 < 1$  であり、かつ  $k_2 > k_3$  である請求の範囲第 1 項に記載のリン脂質誘導体。
7. 請求の範囲第 1 項ないし第 6 項のいずれか 1 項に記載のリン脂質誘導体を含む界面活性剤。
8. 請求の範囲第 1 項ないし第 6 項のいずれか 1 項に記載のリン脂質誘導体を含む脂質膜構造体。
9. 請求の範囲第 1 項ないし第 6 項のいずれか 1 項に記載のリン脂質誘導体を含むリポソーム。
10. 請求の範囲第 1 項ないし第 5 項のいずれか 1 項に記載のリン脂質誘導体の製造方法であって、下記一般式 (2) :



(式中、 $\text{R}^1\text{CO}$  及び  $\text{R}^2\text{CO}$  はそれぞれ独立に炭素数 8 ~ 22 のアシル基を示し；X は水素原子、アルカリ金属原子、アンモニウム、又は有機アンモニウムを示し；a は 0 ~ 4 の整数を示し；Y は水素原子又は N-ヒドロキシコハク酸イミドを示す)

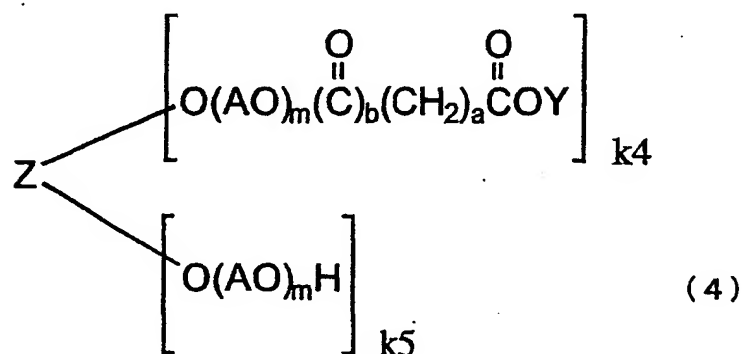
で示されるリン脂質化合物と下記一般式 (3) :



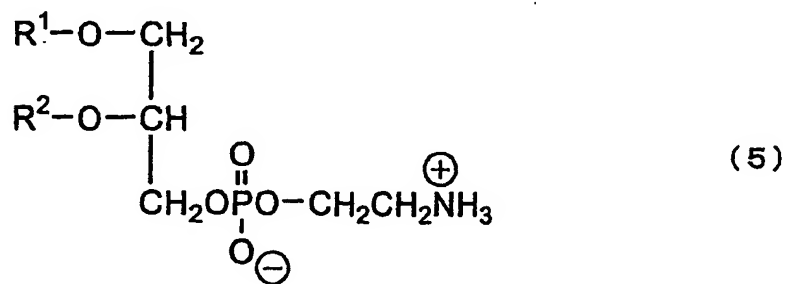
(式中、Z は 3 ~ 10 個の水酸基をもつ化合物の残基を示し；AO は炭素数 2 ~ 4 のオキシアルキレン基の 1 種又は 2 種以上を示し、2 種以上のオキシアルキレン基を示す場合にはブロック状でもランダム状でもよく；m はオキシアルキレン基の平均付加モル数でを示し；m 及び k は下記の条件： $3 \leq m \leq 200$ 、 $9 \leq m \times k \leq 1000$ 、 $3 \leq k \leq 10$  を満足する数である) で表されるポリアルキレン

オキシド化合物とを有機溶媒中で塩基性触媒の存在下に反応させる工程を含む方法。

11. 請求の範囲第1項ないし第3項のいずれか1項又は請求の範囲第6項に記載のリン脂質誘導体の製造方法であって、下記一般式(4)：



(式中、Zは3～10個の水酸基をもつ化合物の残基を示し；aは0～4の整数を示し；bは0又は1を示し；mはオキシアルキレン基の平均付加モル数を示し；Yは水素原子又はN-ヒドロキシコハク酸イミドを示し；k4及びk5は下記の条件： $1 \leq k4 \leq 10$ 、 $0 \leq k5 \leq 9$ 、 $3 \leq k4 + k5 \leq 10$ を満足する数である)で表されるポリアルキレンオキシド誘導体と下記一般式(5)：



(式中、R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は上記式(1)における定義と同義である)で表されるリン脂質誘導体とを有機溶媒中で塩基性触媒の存在下に反応させる工程を含む方法。

12. 請求の範囲第8項に記載の脂質膜構造体と薬物とを含む医薬組成物。

13. 薬物が抗腫瘍剤である請求の範囲第12項に記載の医薬組成物。

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/03966

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>7</sup> C07F9/09, C08G65/335, A61K7/00, 7/48, 9/127, 47/24, A61P35/00  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>7</sup> C07F9/09, C08G65/335, A61K7/00, 7/48, 9/127, 47/24, A61P35/00  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA (STN), REGISTRY (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 6-228012 A (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.), 16 August, 1994 (16.08.94), Full text (Family: none)	1-13
A	TSUTOMU YUDA, KAZUO MARUYAMA, MOTOHARU IWATSURU, "Prolongation of Liposome Circulation Time by Various Derivatives of Polyethyleneglycols", Biological & Pharmaceutical Bulletin, 1996, Vol.19, No.10, pages 1347 to 1351	1-13
A	REINER ZEISIG, KAZUHIKO SHIMADA, SADA O HIROTA, DIETER ARNDT, "Effect of sterical stabilization on macrophage uptake in vitro and thickness of the fixed aqueous layer of liposomes made from alkylphosphocholines", Biochimica. et Biophysica. Acta., 1996, Vol.1285, No.2, pages 237 to 245	1-13
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 08 July, 2003 (08.07.03)		Date of mailing of the international search report 29 July, 2003 (29.07.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/03966

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	T.M. ALLEN, G.A.AUSTIN, A.CHONN, L.LIN, C.LEE, "Uptake of liposomes by cultured mouse bone marrow macrophages: influence of liposome composition and size", Biochimica. et Biophysica. Acta., 1991, Vol.1061, No.1, pages 56 to 64	1-13

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>7</sup> C07F9/09, C08G65/335, A61K7/00, 7/48, 9/127, 47/24, A61P35/00		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>7</sup> C07F9/09, C08G65/335, A61K7/00, 7/48, 9/127, 47/24, A61P35/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA (STN) REGISTRY (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 6-228012 A (第一製薬株式会社) 1994. 08. 16, 全文 (ファミリーなし)	1-13
A	TSUTOMU YUDA, KAZUO MARUYAMA, MOTOHARU IWATSURU, "Prolongation of Liposome Circulation Time by Various Derivatives of Poly ethyleneglycols", Biological & Pharmaceutical Bulletin, 1996, Vol. 19, No. 10, p. 1347-1351	1-13
A	REINER ZEISIG, KAZUHIKO SHIMADA, SADA O HIROTA, DIETER ARNDT, "Effect of sterical stabilization on macrophage uptake in vitro"	1-13
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 08. 07. 03		国際調査報告の発送日 29.07.03
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 吉住 和之 (印) 電話番号 03-3581-1101 内線 3443

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	<p>o and on thickness of the fixed aqueous layer of liposomes made from alkylphosphocholines", Biochimica et Biophysica Acta, 1996, Vol. 1285, No. 2, p. 237-245</p> <p>T. M. ALLEN, G. A. AUSTIN, A. CHONN, L. LIN, K. C. LEE, "Uptake of liposomes by cultured mouse bone marrow macrophages: influence of liposome composition and size", Biochimica et Biophysica Acta, 1991, Vol. 1061, No. 1, p. 56-64</p>	1-13